(4)

特許公報(4) 噩 (E) (19)日本区特許庁 (JP)

特開2000-342256 (11)特許田屋公開毎中

平成12年12月12日(2000.12.12) (P2000-342256A) (43)公開日

	1	
30 30 24 65	16 JE)	
j-71-l'(#4) 1 2B030 1 4B024 3 4B065	10	
. 4 4 O	Ξ	
	春空前次 末前次 請求項の数11 OL (全 16 頁)	82
15/00 1/00 5/00	未翻块	00000456
F1 C12N 18 A01H C12N	を発音を	(71) 田間人 00004569
(51)Int.Cl. (50) C1.2N 15/09 A0.1H 1/00 C1.2N 5/10		JAMOST TIMESTO

(71)出版人 000004569 日本たばこ産業株式会社	東京都港区虎ノ門二丁目2番1号 (T2)免明者 福山井 祐弘 44mm産金田町舎田町町町町の番池 日本た	は「産業株式会社遺伝育種母発所内 は1 原分 件因 四分 幹因保健田野豊田町東図700番地 日本た	ばこ産業株式会社遺伝育種研究所内(7.0)代理人 110088546 弁理士 谷川 英次郎	
(11)田賦子	(72) 発明者	(72) 発明者	(74)代理人	
特 股 平11—158025	平成11年6月4日(1999.6.4)			
(21)出版等中	(22) 出題日			

植物組取への遺伝子導入の効率を向上させる方法 (54) [発明の名称]

(57 [聚粒]

遺伝子導人を行うことができる、植物細胞への遺伝子導 【舞題】 従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導 入方法よりも高い効率で組織を付傷することなく簡便に

【解決手段】 植物細胞又は植物組織を迫心処理するこ とを伴う、アグロバクテリウム属細菌を介して行われる 植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供

人の効率を向上させる方法を提供すること。

【請求項4】 遠心処理が500G~20万Gの遠心加 [請求項3] 遠心処理が100G~25万Gの遠心机 とを伴ろ、アグロバクテリウム属細菌を介して行われる [請求項1] 植物細胞又は植物組織を遠心処理するこ [請求項2] 植物細胞又は植物粗糙を遠心処理した 速度の範囲で行われる請求項1叉は2記載の方法。 値物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法。 後、遺伝子導入処理を行う請求項1記載の方法。 速度の範囲で行われる請求項3記載の方法。

[請求項5] 遠心処理が1000G~15万Gの遠心 【静水項6】 遠心処理が1秒間~4時間の範囲で行わ 【請求項7】 遠心処理が5分間~2時間の範囲で行わ れる請求項1ないし5のいずれか1項に記載の方法。 加速度の範囲で行われる請求項4記載の方法。

【静水項8】 用いる植物細胞又は植物組織が被子植物 由来である静水項1ないし7のいずれか1項に記載の方 れる請求項6記載の方法。

[静水項 8] 用いる植物細胞又は植物組織が単子葉植

【静来項11】 用いる植物細胞又は植物組織がイネ又 [請求項10] 用いる植物細胞叉は植物組織がイネ科 はトウモロコシである請求項10記載の方法。 植物由来である鞘末項9記載の方法。 物由来である請求項8記載の方法。

[発明の属する技術分野] 本発明は、植物細胞への遺伝 子導入の効率を向上させる方法に関する。 【発明の詳細な説明】 [0001]

とができる作物の種類は、現状では一部に限定されてい から、この目的に即し多数の形質転換体を容易に得るこ が限定されており大量の材料を取り扱うことができない 植物種もある。遺伝子組換えにより実用的な品種を作出 ずるには、多数の形質転換植物を作出した上で、目的と する形質を持った系統を遺抜する必要がある。 しかしな ならびに効率は、植物種、遺伝子型ならびに用いる植物 組織に依存して大きく異なるのが実状である(PotrAkus 成功していない植物種があるほか、Cく一部の品種のみ 形質転換が可能な植物種も多い。また、利用可能な組織 et al. 1998(参考文献(33)))。 すなわち、形徴転換に **た特徴を持っている。このため、さまざまな植物機で最** [0003] このように、アグロバクテリウム柱は非常 **に優れた植物の形質転換方法であるが、形質転換の成否** となく導入できる、短期間の培養により形質転換体を得 ることができるため培養変異が少ないなど、多くの優れ は、一般的な、効率が高い、導入される遺伝子のコピー 数が少ない、T-DNという特定の領域を断片化させるこ [従来の技術] アグロバクテリウムによる形質転換法 も有用な形質転換の手段として広く用いられている。 [0002]

梅爾2000-342258

3

る。したがって、このような問題点を解決することがで きる改良手法の開発が強く望まれている。

究例としては、バーティクルガン(Bidney et al., 1992 文献(37))処理が上げられる。どちらも物理的に組織を **苒く、遠伝子導入効率の向上に加え、従来困難であった** 植物種や遺伝子型の形質転換を可能にする顕著な効果も 期待される。これまでの植物組織への前処理に関する研 (参考文献(5))) および超音波(Trick et al., 1997(参考 理的状態に変換することができればたいへん利用価値が る前の値物粗糙を、遺伝子導入が生じやすい生理的状態 **に変換するという考え方に基づく研究は、ほとんど行わ** れていない。何らかの節便な処理により、そのような生 1(參考文獻(38)), kcCormick 1991(參考文献(29)), Lin 成、培地組成、選抜マーカー遺伝子やプロモーターの種 [0005] これに対し、アグロバクテリウムを投稿す 付傷することでパクテリアの植物組織内への優人を促 れる (Rogers et al. 1988(多井文献(34)), Wisser 199 dey et al. 1991(参考文献(28)))。従って、形質転換 な処理を紡ずことなくアグロバクテリウムの恐免が行わ テリウムの壁渦液を接触させ、共存培費の後に形質転換 細胞の遺抜を行い、形質転換値物を作出するという操作 ではほぼ共通している。材料となる植物組織には対して は、通常、必要に応じ敵菌処理を行うがそれ以外に特別 類、供ば組織の種類などを中心に研究が行われてきた。 [0004]アグロバクテリウムを介する形関転換方法 自体は、植物種により供試材料や培養に用いる培地の組 成などを異にするものの、材料となる組織にアグロバク 系の改良は、アグロパクテリウムの留系、ヘクター構 2 2

でなく、一般的な手法として用いられていないのが現状 く処理法ではない。なお、効果の程度や汎用性は明らか し、既处対象となる植物細胞を増加させることを目的と している。しかしながら、これは従来より広く行われて (17)))を発展させたものに過ぎず、新規な考え方に基づ いるリーフティスク法(Horsch et al., 1985(参考文献

導入を行うことができる、植物間胞への遺伝子導入の効 は、従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法 よりも高い効率で組織を付傷することなく間便に遺伝子 【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的 **率を向上させる方法を提供することである。** [0000]

7.85.

組結を違心処理することにより、遺伝子導入効率を有意 【蝶題を解決するための手段】本願発明者らは、鐵意研 究の結果、アグロバクテリウム阪細菌を用いた遺伝子導 入方法において、遺伝子導入に供する植物細胞又は植物 に向上させることができることを見出し本発明を完成し [0001]

50 機を迫心処理することを伴う、アグロバクテリウム呪齬 [0008] すなわち、本発明は、植物梱胞又は植物組

笛を介して行われる植物細胞への遺伝子導人の効率を向 上させる方法を提供する。

棟させてもよい。好ましくは、植物細胞又は植物組織を [発明の実施の形態] 本発明の方法では、アグロバクテ リウム関和菌を介した遺伝子導入方法において、遺伝子 を導入する植物細胞又は植物組織を違心処団することを **浄う。植物細胞又は植物組織は、遠心処理した後、通常** の取力下でアグロバクテリウム属相菌と接触させてもよ いし、遠心処理しながらアグロバクテリウム属細菌と接 遠心処理した後、通常の重力下でアグロバクテリウム属 **間菌と接触させる方法である。**

じて適宜選択されるが、通常、100G~25万G. 好 向上させることができる。一方、遠心加速度が小さい場 [0010] 遠心処理条件は、用いる植物の種類等に応 ましくは500G~20万G、さちに好ましくは100 強心処理の時間は、遠心加速度及び用いる植物の種 類等に応じて適宜選択されるが、通常1秒間以上行うと とが好ましい。なお、遠心時間の上限は特にないが、適 頃い時間、例えば1 秒以下でも遺伝子導入効率を有意に 台には、遠心処理を長く行うことにより遺伝子導入効率 を有意に向上させることができる。特に好ましい遠心処 50000Gで1秒間~2時間程度の場合が多いが、そ お、遠心処理時間は、遠心加速度が大きい場合には極く 照条件は、500G~20万G、特には1000G~1 第、10分階程度で目的を達成することができる。 な 0G~15万G程度の途心加速度範囲で行われる。ま

[0011]本発明の方法は、アグロバクテリウム属細 頃と接触させる植物細胞又は植物組織として遠心処理し たものを用いる、又は途心処理を行いながちアグロバク テリウム属細菌と接触させることを特徴とするものであ り、アグロバクテリウム属細菌を用いた遺伝子導入ある いは形質転換方法自体としては、周知の方法をそのまま **改用することができる。**

の植物植物又は植物組織によっての通りな道心処理条件

は、ルーチンな実験により容易に散定することができ

【0012】アグロバクテリウム原細菌を用いた植物へ の遺伝子導入あるいは形質転換方法自体は、この分野に **ないて周知であり、広く用いられている。**

ium tumefaciens) が多くの双子菜植物に根頭癌腫病 (c 【0013】土壌細菌アグロバクテリウム(Agrobacter hており、1970年代には、Tiブラスミドが病原性に関与 **物ゲノムに組み込まれることが発見された。その後この** /とオーキシン)の合成に関与する遺伝子が存在し、 相 菌遺伝子でありながら植物中で発現することが明らかに された。T-DWの切り出しと植物への伝達にはTiブラス rown qall disease) を引き起こすことは古くから知ら すること、さらにTiブラスミドの一部であるT-DMが値 I-DNAKは拍脑の誘発に必要なホルモン(サイトカイニ

S

アグロバクテリウム函補扱であるAgrobacterium rhizog 子群が必要であり、またT-DNAが切り出されるためにはT -UNAの両端に存在するボーダー配列が必要である。他の enesもRiブラスミドによる同様なシステムを有している ミド上のグィルレンス短数 (Ar舷域) に存在する遺伝 (図3及び図4)。

ることが期待された。しかしながら、Tiブラスミドは19 伝子を挿入するとこの遺伝子も植物ゲノムに組み込まれ 【0014】アグロバクテリウムの題祭によってT-DNA が植物ゲノムに組み込まれるので、T-DM上に所望の遺 Oku以上と巨大であるため、環準的な遺伝子工学手法で はブラスミド上のT-DNA上に遺伝子を挿入することは困 誰であった。そのため、T-DNA上に外来遺伝子を挿入す るための方法が開発された。

アーム型TiプラスミドのT-DM領域中に、三系交雑法(t ホルモン合成遺伝子が除去されたディスアーム型の菌系 al., 1983(参考文献(40)))、GV3Ti11SE(Fraley et al., らを用いることにより、所望の遺伝子をアグロバクテリ 子を有するT-DNAをアグロバクテリウムに導入する2種類 の方法が開発された。このうちの一つは、遺伝子操作が 容易で所望の遺伝子の挿入が可能であり、大腸菌で複製 ができる中間ベクターを、アグロバクテリウムのディス 1983(参考文献(12))), C58C1(pGV3850) (Zambryski et 【0015】まず、腫瘍性のTiブラスミドのT-DNAから (disarmed strains) であるLBA4404(Hoekema et al., 1985(参考文献(9)))などが作製された (図3)。これ ウムのTiブラスミドのT-DW中に、あるいは所望の遺伝 riparcotal mating) (Ditta et al., 1980(参考文献 (8)))を介して相同相換えにより導入する方法であり、

杜発行(1989)))、vid域域とはこのvirk virB. vir 文联(9)); Fraley et al., 1983(参纬文赋(10)); Zathr (EP116718))。もう一つは、パイナリーベクター (bin (植物パイオテクノロジー事典 (エンタブライズ株式会 り行うことができる。パイナリーベクターには、pEINL9 vski et al., 1983(参考文献(40))、特開昭59-140885号 めに同じブラスミド上に存在する必要はないという結果 リウムと大脳窟の両方で複製可能な小さなブラスミドに 組み込んだものであり、これをディスアーム型Tiブラス (Hoekama et al., 1983)に基づいている。このvir戯域 ミドを有するアグロバクテリウムに導入して用いる。ア エレクトロボレーション法や三条交雑法などの方法によ C vin. vift及びvinの全てを含むものをいう。した (Bevan, 1984(参考文献(4)))、pBI121(Jefferson,1987 中間ベクター法と呼ばれる(Fraley et al., 1985(参考 ary vector)法とよばれるもので(図3)、T-INMの値 物への組み込みにvir航域が必要であるが、機能するた にはかれ、virg virg、virg、virgyびvirgが存在し、 がって、パイナリーベクターは、T-DNAをアグロバクテ グロバクテリウムへのバイナリーベクターの導入には、 (参考文献(19))), pG4482(An et al., 1988(参考文献

れらをもとに数多くの街たなパイナリーベクターが構築 ドのシステムにおいても、回様なペクターが構築され形 Q))、特開昭60-70080号 (EP120516))などがあり、C され、形質転換に用いられている。また、Ri ブラスミ 質板数に用いられている。

の菌系であり、その宿主範囲は広く、形質転換効率も他 の菌系より高い(thood et al.,1987(参考文献(113)); Kom ari, 1989(参考文献(21)))。この特性は、A2BJが有する [0016]アガロバクチリウムA281(Watson et al., 1975(参考文獻(39)))は、強病原性 (super-virulent)

いシステムが開発されている。一つはpriBo542のディス のであり、これらを上述のバイナリーベクターシステム **に適用することにより、形質転換能力の高いシステムと** ロブラスミ FのpTiBo542によるものである(Ibod et a 1., 1984(参考文献(16)); Jin et al., 1987(参考文献 1.,1986)およびEM105(Hood et al., 1993)を用いたも [0017] pribosaを用いて、これまでに2つの折し (20)); Komari et al., 1986(参考文献(24)))。

アーム型のTiブラスミドを有する菌系EM101(Hood et a して確々の植物の形質転換に利用されている。もクーク tor) (Hiei et al., 1994(多考文献(11)); Ishida et a は、スーパーパイナリーベクター ('super-binary' vec (図4)。このシステムは、vir樹萸 (virA、virB、vir C vin vire Boving (以下、これらをそれぞれ「vir (Komariet al., 1996(参考文献(25)))。 このスーパーバ 1994(参考文献(11)); Ishida et al., 1996(参考文献(1 1., 1996(參考文獻(18)); Komari et al., 1999(參考文 棋(26))、WO94/00977号、WO95/06722号)システムである 断片領域」ということもある。))を持つディスアーム も一つのと、南下館域を実質的に収除いたと、超級の地下 (このうち好きしくは少なくともご品又はvicを合む形 ナリーベクターを有するアグロバクテリウムに、所望の ステムと比べて、多くの植物種で非常に高い形質転換効 なることから、パイナリーペクターシステムの一種であ る。しかしながら、T-DNAを有する側のブラスミド、即 片、さらに好ましくはvirB及びvinを含む断片)を組み リーベクターを用いる点で異なる。なお、スーパーパイ 維法を介した相同組換えが容易な手法として利用できる イナリースクターツステムは、上海の極々のスクターツ 型のTiブラスミドねよびT-DMを省するブラスミドから もパイナリーペクターにvir街片領域のうち、少なくと 遺伝子を組み込んだT-Dvs領域を導入するには、三系交 帯をもたらすことが思らかとなっている(Hiei et al., 込んだ(Komarri, 1990a(参考文献(22)))スーパーパイナ 8); Komari, 1990b(参考文献(23)); Li et al.,1996 (参考文献(27)); Saito et al., 1992(参考文献(3

Agrobacterium tumefaciens (例えば上述のAgrobacter 【0018】本発明の方法にねいては、宿主となるアグ ロバクテリウム原細菌としては、特に限定されないが、

iumtumefaciens LBA4404(Hockema et al., 1983(都书文 特開2000-342258 联(12)))およびElM101(Hoodet al., 1986(参考文献(1 5))) を好ましく用いることができる。

€

く有意な効果を得ることができる。したがって、上述の のベクターシステムに対しても用いることができ、本発 明による効果を得ることができる。これらのベクター知 を改変した異なるベクターシステムを用いた場合におい ても回接である (例えば、アグロバクテリウム属細菌の 所たなプラスミドの一部としてアグロバクテリウムに導 【0018】本発明の方法によれば、アグロバクテリウ に基づく遺伝子導入系であれば、特に限定されることな 中国スクター、スイナリースクター、钨栓原和のスイナ リーベクター、スーパーパイナリーベクターなどいずれ 人するなど)。また、当然ではあるが本発明の方法によ 4属細菌における病原性 (vir) 奴域の遺伝子群の発現 Arad数の一部または全部を切り出し行加的にブラスミ ド中に組み込む、いん飢场の一部または全部を切り出し **たば、野生類のアグロバクテリウム国籍的においても、**

に基づいて選択することができる。大型で多数の勧殴部 より組み込むことができ、当数ブラスミドに同時に若し くは別済街込んだカナレイツン、パロモレイツン毎の駅 **剤に対する耐性を有する遺伝子等の適当な選択マーカー** 位を持つものは、通常のサブクローニングの手法では所 纽のDNAをT-DNA奴政内に導入することが必ずしも容易で ないことがある。このような場合には、三系交雑法によ り、アグロバクテリウム属植図の種型内での相同組換え [0020] 植物に導入しようとする所型の遺伝子は、 上記プラスミドのT-DW超越中の超風群群倒位に依抗に を利用することで目的のDNAを導入することができる。

植物へ野生型のT-DVA銀域の導入効率を高め、中央上路

炊効率を向上することができる。

[0021] また、ブラスミドをAgrobacterium tumefa 従来法により行うことができ、例としては、上記した三 **承女雑法やエレクトロポフーション法、エフクトロイン** ciens等のアグロバクテリウム原細菌に導入する操作は ジェクション法、氏のなどの化学的な処理による方法な どが含まれる。

[0022] 植物に導入しようとする遺伝子は、従来の ため、境界配列の数は1つでもよく、複数の遺伝子を異 で、TiまたはRiブラスミド上に配置されてもよく、また は他のブラスミド上に配置されてもよい。さらには、複 技術と回様に基本的にはT-DNAの左右境界配列の間に配 聞されるものである。しかし、ブラスミドが取伏である 以上あってもよい。また、アグロバクテリウム属相館中 なる部位に配置しようとする場合には、境界配列が3個 数の種類のブラスミド上に配置されてもよい。

テリウム関相菌と単に接触させることにより行うことが できる。例えば、10,~10,1個数/m1程度の細胞 【0023】アグロバクテリウム區舗점を介した遺伝子 導入を行う方法は、植物細胞又は植物組織をアグロバク S

[0024] 遺伝子導入に供される細胞又は組織は、何 5限定されるものではなく、葉、根、茎、実、その他い しく、被子植物ならば双子葉植物でも単子葉植物でもよ ずれの即位であってもよいし、カルスのような脱分化し た、植物の種類も何ら限定されないが、被子植物が好ま たものでも脱分化していない胚等であってもよい。ま

[0025] 下配実施例において具体的に示されるよう C、本発明の方法によれば、従来のアグロバクデリウム 佐に比較して、遺伝子導入の効率が有意に向上する。 [0026]

说明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定される 【実施例】以下、本発明を実施例に基づきより具体的に ものではない。

[0027]狀結図1

()cfferson RA 1987(参考文献(19))), LBA4404 (pIG121 (pTOK233)(Hiei etal., 1994 (参考文献(111)))ねよびL アグロバクテリウムおよびそのベクターには、LBA4404 th) (Hiei, Y. et al., 1994(参郑文撰(11)), LBA4404 (p81121) (p81121は米国クローンテック社より市販 (1) アグロバクテリウムの菌系およびブラスミド BA4404(pSB1)3) (図2)を用いた。

omari et al., 1996(多考文献(25))をSalTで消化して得 花機. Triparontal matind芷(Ditta G et al., 1980(參 株Sal Iで消化して得た6.2 はのDNA断片を、pSBLL(K してゾラスミドpS827を得た。このpS827を制限酵型Hind IIで消化し、pIQ21(Chta S et al., 1990(参考文献(3 [0028]なお、pSB133の構築は、以下のように行っ た。pCA482(An G et al., 1985(各考文献(3)))を制限時 製した。次いで、このブラスミドを制限酵素EcoRL、Bgl ITで消化して8.6 MのDNA断片を得た。このDNA断 2))をHind IIIで消化することで仰られる3.1 kbの355ブ られる5.1 kpのDNA断片と結合してブラスミドを作 rを平滑化処理し、BallIリンカー(TaKaRa社製)を挿入 **ゆ入してpSB33を得た。pSB33を大腸菌LE392株に導入し** ロモーター及びイントロン介在GUS遺伝子を含む断片を 考文献(8))により、pSR1(Komari et al., 1996(参考文 した。pSB133はアグロバクテリウム内でpSB1とpSB33の 間の相回組換えにより得られた。p81121のT-DNの領域に は、ノバリン合成酵素遺伝子 (nos) のプロモーターに 献(25)))を有するアグロバクテリウムLBA440株に導入

201-UNUU域には、nosプロモーターにより制御されるn 1遺伝子、355プロモーターにヒマのカタラーゼ遺伝子の イントロンが外在するQIS遺伝子を有する。また、pSB13 力が聞いスーパーパイナリーベクター(Komarri, T. et a ptII遺伝子、CaMO355プロモーターに制御されヒマの カタラーゼ遺伝子のイントロンが介在するCIS遺伝子を 有する(図2)。なお、pSB133及びpT0k233は形質転換能 1., 1999(参考文献(26))である。

供試品程として、日本稲品種のコシヒカリおよび月の光 を用いた。開花後8~14日目の未熱種子の類を除去し、7 0%エタノールで数秒、ツイーン20を含む1%次亜塩素酸 ナトリウム水溶液で15分間減菌処理を行った。 敏菌水で 数回洗净後、長さ1.5~20000未熟胚を摘出し供試組織と [0029] (2)供試品権および組織 Ę,

[0030] (3) 遠心処理

イネ未熟胚を破留水入りのチューブの中に入れ、微量高 遠遠心機、大型南通遠心機もしくは超南遠遠心機を用い 7606~150,0006の遠心処理を行った。遠心処理終了 後、未禁胚にアグロバクテリウムを接種した。

[0031] (4) 接種および共存培養

10日間培養したアグロバクテリウムのコロニーを白金 アミノ酸及びAAピタミン類(Toriyama K. et al., 19 85(參考文献(36)). MS微量塩類 (Murashige, T et a 1., 1962(参考文献(30)), 1.0 q/1 カザミノ酸、100 μ **理後、チューブ内部の被菌水を除き、アグロバクテリウ** (Chilton, M-D et al., 1974(参考文献(G))) 上で3~ 耳でかきとり、修正AA培地(AA主要無機塩類、AA (1994) (参売文献(11)) によった。すなわち、辺心弘 ムの懸御液を加え、5~30秒間ポルテックスミキサーに より攪拌した。パクテリア懸樹液の調製は、AB培地 Mアセトシリンゴン、0.2 Mショ核、0.2 M グルコー 末熱胚への接種および共存培養の方法は、

1)) 。 すなわち、共存培養処理直後、組織を0.1% Trito 祖としては、2N6-ASA苗(Hiei et al. 1994(参札文献(1 (31)))の組成に変更して用いた。ただし、主要無機塩類 (KNG, KH.PQ, CaC1, 2H.O, MASQ, 7H.O) については1/2 リウムを除去した後、1.0 mM 5-プロモー4-クロロ した後、共存培養用の培地に置床した。共存培養用の培 37.Cで1時間静置した。リン徴検衝液でアグロバクテ い、一部の未禁困なついてx-clucを処理することによる - 3 - インドリル- ターローグルクロン酸 X-aluc) およ **び20% メタノールを合むリン数額衝液を添加した。37** ス) 化懸御することにより行った。約5分間室温で静置 ~1×10° cfu/ml に関数した。共存培費は3~13日間行 1)))の無機塩類をR2培地(Chira et al. 1973(参考文献 **GIS発現を関査した (Hiei et al.1994) (参考文献(1** n X-100 を含む0.1 M リン散級衝液(pl6.8) に浸漬し、 の濃度で培地に添加した。なね、接種菌密度は1×10

特別2000-342256

9

カザミノ酸、2 mg/l 2, 4-D)の(N4,),50,を232 m g/lとしAM倍地(Toriyama et al., 1985(参考文献(36))) ロモマイシンまたは10~30mg/1ハイグロマイシンを包む た。1次週抜培地には、 Hiei et al. (1994)(参考文献 共存培養後、未熱胚およびカルスを250mg/1 カルベニシ した培地を用いた (A含地)。また、Hiei et al. (199 アタミン類 (Crn C. C. 1978 (参札女(イン)), 1 d/) リンおよび250mg/1 セフォタキンムを含み、200mg/lパ (11)) による2NGd始に30g/1のD-ソルビトールを添加 4)(参考文献(11))による2NG倍也(N6の無数塩および 1次選抜培地に移植し、30℃明条件下で1~3週間培養し のアミノ酸類を添加した培地についても試験に供した [0032] (5) 形質転換細胞の選抜

[0033]1次週抜培地上に形成されたカルスを、250 イシンを含む2次選抜培地上に移植し、30℃明条件下で1 ~2週間の培養を行った。2次選抜培地には、Hiei et a 1. (1994) (参考文献(11)) によるN6-枯粕 の(NN,),5 培地には、培地固化剤に8g/1アガロースを使用した。耐 お、パロモマイシンを合有する上記の1次ねよび1次遺抜 文献(36)))のアミノ敵類を添加した培地を使用した。な ng/lセフォタキシムおよび250mg/lカルベニシリンを会 み、200mg/ハパロモマイシンもしくは80mg/ハパイグロマ Gを232 mg/lとしAA倍地(Toriyama et al., 1985(安考 性カルスの出現率は、2次进抜後に調査した。

未熱胚の胚盤制位から得られた遺抜薬剤耐性のカルス [0034] (6) 形型転換体の再分化

ロマイシンを含む再分化培版N6S3培版(Hiei et al. 199 を、250mg/1カルベニシリンおよび250mg/1セフォタキシ ムを包み、100mg/lパロモマイシンまたはS0mg/lハイグ 4(参考文献(11)))上に置床した。

た各類剤耐性の再分化植物の葉片を、上記のようにx-Gl ucを処理することにより、GLS発現を調査した(Hiei et 41.1994(参考文献(11)))。用分化個体は500倍のHvp 25、C明条件下で4~5週間の再分化培費を行なって得られ oneo水溶液中に移植し、25℃明条件下で約2週間費苗し [0035] (7) 再分化個体におけるQIS発現の調査 た後、福室内のボットへ移植した。

[0036](8) 結果 (i)遠心処理効果の検討

から、ほかの植物種を含めて、培養におけるカルスの酵 用いてイネの未熟胚への遠心処理効果を調べた結果,10% Cdvら100KGの範囲の処理で遺伝子の導入効率が高まった られなかった。なお、遠心処理は遺伝子導入効率の向上 だけでなくカルス誘導を促進する効果が認められたこと 資量高速遊心機、大型高速遊心機および超高速遊心機を (表1, 2, 3, 6)。処理時間については10分間の処理で明 **らかな効果が認められた(桜4,5)。また、コンヒカリと** 月の光の品種間でのGISO一週往発現頻度に違いは認め

[0037] 数6の結束から超高透過心臓を用いた250K **く認められなかった。しかし、110kgの60分処阻ではカル** ス誘導が確認され、GIS発現も高率で認められた。 回様に コシヒカリについても超高波速心極を用いた250 KG-60 分処理では、未熟胚からのカルス誘導が認められなかっ 考慮すると欲重高適適心機ねよび大型高速適心機を使用 た。以上の枯果から、イネ末熱胚における遠心処理の効 の60分処理では、月の光未熟胚からのカルス緊導が全 県の範囲は3KC~200KCと考えられ、処型方法の値便性を する場合には、2002、4002処理が適当と考えられる。さら **身および増殖に有用であることが示唆された。**

培養期間が9日についても別の実験で高いGJS先現が認め られた。現在、共存培養期間が異なる各種未熟胚を一次遺 ン)で始接しているが、9,13日共存の区では、3,6日の共存 表-7,800結果から共存培養期間が3日より6,13日がト ランジェントアゥセイで苗いQUS発現効率を示した。共存 抜品街上(10ppm/イグロレイツン, 200ppm/ロキレイツ 区と比較して栗和耐性カルスの出現率が低い傾向にあ 用いた形質転換が可能であることが明らかとなった。 【0038】(ii) 遠心処理と共存培数期間の検討 2

3)のみなのか、適体のベイナリースクターかある1844494

(pIGI211m)でも、20KG・60分の遠心処理により未熟胚を

に表9,10,11の結果から、形質転換能力が高いとされ るスーパーパイナリーベクターを有するLB44404(pSB13

【0039】(iii) 強心処理による形質転換効率の製

をそれぞれ頃化し、拠培を継続している。一部分の系統に 現在、上記により作出したcus場性の形質転換体(没4,5) ついては、採組を終了し給性間弦を行った。その結果、迫 心処理した形質転換体は無処理の形質転換体(コシヒカ リ、月の光)と比較し、形態ねよび松性に登は認められな

は、イネのカルスを材料として比較的高い効率で形質転 **換が行うことができることを報告している。また、Aide** mita RR et al. 1996(各名文献(1))は、イネの米松田を (0040) Hiei et al. (1994 (春春文献(111)))

用いた形質転換例を報告している。これらの形質転換手 法をより効率よく安定して契約するために、上述した盗

に左右されやすく形質転換に好適な未熟配材料を常時得 ることは容易ではないが、強心処理を施すことにより安 心処理法は非常に有効である。特に、未熱断は殺恃環境 力の成こんクターわめのスーパースイナリースクターが 4]demita et a]., 1996(参考文献(1))によれば、スーパ - バイナリーベクターのLBAMの(pTQQ33)を用いた試験 においてのみ、形質核液体を得ている。本研究における 定した高い形質配換効率を推持することが可能である。 Hiei et al. (1994 (参考文獻(11)))は、形質航投館 イネの形質転換効率を向上させることを示した。また、

遠心処理法は、通常のパイナリーベクターを用いた場合

ន

・Cで24時間処理した後、骨色の昼色を示す組織を取像

ន

hるnptII遺伝子、355プロモーターにより制御されるhp

-により制御されるcus遺伝子を有する。pICL211fm及びp

リフラワーモザイクウィルス (CAM) の35Sプロモータ

より制御されるカナマイシン耐性遺伝子(nptII)、カ

IDG33の1-DV越越には、vosプロモーターにより創留さ

8

特開2000-342258

で全く形質転換体を得ることができなかった品種におい ても形質転換体を得ることができるものと推察される。 においても、スーパーパイナリーベクターに匹敵する

[0041] か、それ以上の遺伝子導入効率を得ることができる。ま ることにより、より一層効率を向上させることが可能で た、スーパーパイナリーベクターと遠心処理法を併用す

(表1)表1 各種遠心処理と共存培費後のans発現結 果 (供試菌系: LBA4404/pSB133) ある。さらに、遠心処理法を用いることにより、これま*

19, 100 0 1/10(+++) 7/10(+++) 7/10(+++) 7/10(++) 1/10(++) 4/10(±) 8/10(+++) 8, 500 0 2/10(+) 6/10(+) **6**√10(**+**) Ø10(−) 3/10(+) 9 09/ 3/10(+) 4/10(+) \$/10(+) 1/10(+) 無名用 被数回数据 (cfu/ml) ---1×10 × 5 1 × 10 コシとカリ 444 月の米

% [0042] 图心处理時間:10分,共存培發期間:3~5日,GUS開生

未熟胚数/供其未熟胚数

[表2] 表2 コンヒカリ未敷胚からのパロモマイツン

()内は胚盤におけるOS発現領域の面倒 --なし,+:

ж

耐性カルスの出現率 (供試箇系: LBM404/pSB133)

小, 4:4, 44:六

李磁铁	令強性 按检查单		現る甘泉南		
亞	(cfu/al)	無処理	760 0	8, 500 0	19,100 G
	1 × 10 ⁴	4.6%(1/21)	0.0% (0/22)	15.0% (3/20)	31. 83 (7/72)
23.52	1 × 10°	4. 5% (1/23)	4.64(1/22)	18, 74 (3/18)	13.55(2/15)
	1×10°	a. 0% (0/21)	0. 0% (0/22)	14. 3% (3/21)	18. 2% (4/22)
# #	1×10	0.0%(0/23)	0.0%(0/21)	Q 05 (0/18)	0.05 (0/22)

★[0043] **耐性カルスの出現した未熟配数/供試未熟胚数、2次遺**

【数3】数3月の光未熟胚からのパロモマイシン耐性力 ルスの出現率(供試菌系: LBAA404/pSB133) * 遠心処理時間:10分、共存培登期間:3~5日

38. 41 (4/11) 45.6%(5/11) 54. 58 (6/11) 9. 15(1/11) 19, 100 @ 30.09(3/10) 27. 3% (3/11) Q ON (0/10) | 0. ON (0/15) | 9. 1% (1/11) 0.08(0/11) 8, 500 G 0.08(0/11) 0.08(0/11) a 04 (0/11) 0.04 (0/11) Q. ON (0/11) 9. 1% (1/11) 語し加速 780 0 無処理 **今路位 存款回应**应 (cfu/al) = 1 10 1 . 10 1 × 10 はなる 뿧

☆[0044] 団性カルスの出現した未熱胚数/供試未熱胚数,2次選

进心処理時間:10分,共存培養期間:3~5日

【表4】表金の心処理時間と共存培養後のGUS発現結果 (品集: コツカセラ) ✡

10/10(+++) \$ 8 10/10(++) 10/10(+) **₹** 国物质综合规 8/10(++) 10/10(+) 10分 (*)01/6 D/10(+) 無約期 LBAA 404 (p (DK233) LBM 404 (650133) 個条及び 7572 F

遠心加速度:20,000G、供試品種:コシヒカリ GUSB性

[0045]

未热胚数/供其未熟胚数

【表5】 表-5 遠心処理時間とパロモマイシン耐性カル

スの出現率 (品種:コシヒカリ) 肝盤質型におけるOS発現質域の面積 +:小、++:中, ++

特開2000-342256 8

Ę

李磁符				连心机理阵则		
報	6条条件	#	無処理	10%	808	608
	╾	腔	OF 0.0% (0/31)	34.35(19/36)	35.0%(14/40)	E3. 3% (16/30)
	ĝ					
本 数	*	胚	FF 0.0%(0/32)	54. 1% (20/31)	34.25(13/38)	58.65(17/29)
	(කුරු					
	E	犘	FF 0. 05 (0/31)	20.05 (1/36)	38.6%(15/39)	40.00(12/30)
	(30C)					
华	뇯	ĮŽ.	FF 0.08(0/32)	48. 6% (17/36)	41.05(16/38)	S3. 5% (10/30)
	(SQC)					

* [0046] 遠心加速度:20,0000、共存培發期間:3~5日,2次遺抜

[表8]表6 遠心処理強度と共存培費後のars発現。B

4: 月の光) **耐性カルスの出現した未熱胚数/供試未熱胚数**

		H H H H			
各種道む 共存協権	共存培徒	経過におり	医型における ens 発気和度	1,41,94 1,41,94	
200			+1	+	‡
1	3670		Ţ	0	0
# X2 H	0 H 🕅	0	2	6	2
į	50 11 60	0	•	~	_
SONO	8800	•	0	,	9
	図86		0	1	9
- FORT	0 B B	0	0	0	10
a d	E .	_		•	_
3	6 H 🐯	0	٥	2	
-	E	2	•	0	
	200	9	۰	•	0

供試商系:LBA4404/pIC121/hm 、過心処理時間:60分

1) 後重高速達心機 2)大型高速速心機 3)超高速速心

胚盤部に占めるQS発現領域の割合 -:なし,±:<1/8,

[0047]

+:1/8-1/4, ++:>1/4

[数7]数7 強心処理および共存培養期間と共存培養後のas発現(品種:月の光)

特開2000-342256 ච

ä

		未算压性			
の関係を		FEE CAL	肝壁における eus 発現頻度	CARIX	
16.79 16.79	MILES .	ı	+1	+	#
	Mae	9	•	1	0
***	98	•			~
	13 B (E)	٥	9	2	3
	388	۰	7		
2000	9 H 53	•	_	6	
	13 8 7	0	_	8	
	3 8 2	•	_	_	~
4000 n	800	۰	۰		~
	8 0	-	_	•	,

*+:1/8-1/4, +:>1/4 ≈ 供試图系:L8A440A/pIGL211th 、1)微粒南波送心插

それぞれの回転数に対し、60分間の遠心処理

【数8】数8 遠心処理ねよび共存培養期間と共存培養 [0048]

胚盤部に占めるQLS発現類域の割合 -:なし,±:<1/8, *20 後のQLS発現(品種:コシヒカリ)

		提班以 非			
を使う		医雙氏物的	胚壁における 🛍 発現知度	1.相连	
2.12 2.13	1	1	+1	+	1
	3.8	,			0
気を	E :: 0		_		
	13日間	_	•	2	_
	a	_	•	_	
2000	9 H 86				•
	13 日間	0	0	_	•
	38	_	•		40
a 800	8 E E		•		2
	13 813	٥	0	_	•

X+:1/8-1/4, ++:>1/4 ≈ 供試图系:LBA4404/pICI211m, 1)液量高速迫心機

それぞれの回転数に対し、60分間の迫心処理 大型商通道心機

[表9]表9 LBA4404(pBI121)による形質転換結果(品 [0049]

種:月の光) 配数部に占めるQS免現領域の割合 -:なし,±:<1/8, ※40

形質転換物料 24.000 (£) 0.95 **GLS 配性数** 3, 数化な 各種地理 供某术物匠处 母の名詞 150 8 無処理

遠心処理:20KG·60分 共存培養5日間

[0000]

【表10】表10 LBAA404(pIC1211m)による形質転換格

果 (品種:月の光)

特開2000-342256 9

17				
各種処理	供文本格配数	様化数	強料型 SB	形質和
無処理	\$		3	7.6(%)
				L

数ない

共存培養5日間 遠心処理:20KG-60分

* (表11) 表11 1844404(p81121)による形質転換結果 (品種:コツトカリ)

各後四	供的採掘数	深地	OLS (EPISK)	形型配数率
一种	48	4	2	4 160
を必ず	274	æ	a	096.6

通心処理:20KG·60分 共存培養5日間

[0052]

※ [表12] 表12 LBA4404(pSB133)による形質転換結束 (品種:コシヒカリ) ×

形質研修如序	0900	8 260
as (B)		z
原像	0	30
(VECKANITAL	83	1
外边理	制理	游心如

遊心処理:20KG·60分 共存培養3日間

大きさ約1.2 mmのトウモロコシ末熟胚 (品種A188, 鳳林 IS-inf液体格地で一回発浄した。遠心院に未熟限と100 水産省生物資源研究所より入手)を無菌的に取り出し、 [0053] 実施例2

x 10 cfu/mlの過度で、Agrobacterium tumefaciens LB を懸濁した液を加え、40,000c, 4"Cで30分間遠心処理し た。対照の未熱胚は、前記と同様の相磁整御液中で30分 uMのアセトシリンゴンを含むLS-inf结构2.0 mlに約1 M4404(pSB131) (Ishida et al. 1996(参考文献(18)))

た。無菌的に取り出した未熟胚をLS-inf液体培地で一回 **冼浄した後、同液体培恤を含む違心管に移し、20 KGま** を除き、約1 × 10° cfu/miの過度でLBA4404(pSB131)を たは40 KGで4で、1時間の遠心処理を行った。対照は液 体培地中で1時間、窒温で静置した。処理後、液体培地 た、遠心処理後の未熟胚への接種は、以下の通り行っ 植面が培地に接するようにLS-AS培地に留床した。ま

を含むLS-AS培地に置床した。25℃、暗黒下で3日間共存 基潤した液を加え、板やかに撹拌した。5分間室温で静 告費した後、一部の未熟胚を採取し、実施例1と同様に (-gluckよりcus遺伝子のトランジェントな発現を調査 **置した後、胚軸面が倍地に接するように10 μM AGNO**,

した。なお、上記の倍増および培養法は、Ishida, Y.et al. 1996(参考文献(18))に記載の方法に従った。

ともに遠心処理を行った場合、遠心処理後アグロバクテ 米熱胚に比べ、遠心処理を行った米熱胚では、より広い 範囲での発現を示すものが多く確認された。逸心処型に よる遺伝子導入部位の増大は、アグロバクテリウム菌と [0054] LBA4404(p58131)を接種したA188本熱胚で いずれの未熟胚もCUS遺伝子の免現を示したが、対照の のQIS遺伝子のトランジェントな発現を表13K示す。

リウム協を接触した場合の両方で認められた。また、遠 心強度及び処理時間を変えた場合でも対照に比べより広 【0055】以上の結果から、遠心処理した未然胚を遺 い範囲でのdis遺伝子の発現が認められた。

間、室温で静置した。処理後、複やかに攪拌した後、胚

抜悟地で培養すれば、対照に比べより高い効率で、形質 **応換植物の得られる可能性が示された。また、従来のア** グロバクテリウム法では形質転換できなかったA188以外 8)) についても遠心処理することにより形質転換値物 のトウモロコシ品種 (Ishidaet al. 1996(参考文献(1

の得られる可能性が示唆された。

A188本熱胚でのGK遺伝子のトラ [表13]表13 ンジェントな発現

対照は1 GCの処型。試験1はアグロバクテリウム菌共存 ドで遠心処理を行った。試験2は遠心処理後、アグロバ

カテリウム菌の接種を行った。

ム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で、組織を付 植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法が提供 された。本発明の方法は、単子葉植物に対しても双子葉 [発明の効果] 本発明により、従来のアグロバクテリウ 傷することなく節便に遺伝子導人を行うことができる、 植物に対しても適用可能である。

[0058] 参考文献

& Nester, EW., (1985)New cloning vehicles for tran 988) Binary vectors. In Gelvin, S.B. and Schilpero ort, R.A. (eds.), Plant Molecular Biology Manual A (2) An, G., Evert, P.R., Mitra, A. and Ha, S.B. (1 (4) Bevan, M. (1984) Binary Agrobacterium vectors (1) Aldemita RR, Hodges TK (1996) Agrobacterium tu mefacions-modiated transformation of japonica and (3) An, G., Watson, BD., Stachel, S., Gordon, MP. for plant transformation. Nucleic Acids Res., 12, sformation of higher plants. EMBO 3., 4:277-288. 3. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp. 1-19. indica rice varieties. Planta 199: 612-617

\$ ile bombardment of plant tissues increases transfo mation frequency by Agrobacterium tumefaciens. Pl M., Sims, L., and Huffmarm G. (1992) Microproject (5) Bidney, D., Scelonge, C., Nartich, J., Burrus, ant Mol. Biol.,18, 301-313.

(6) Chilton, M-D., Currier, TC. Farrand, SK. Bendi un tumefaciens DNA and PS8 bacteriophage DNA not d etected in crown gall tumers . Proc. Natl. Acad. S ch, A.J. Gordon, NP. &Nester EW. (1974) Agrobacteri

(7) Chu, C. C., (1978) Proc. Symp. Plant Tissue Cu lture, Science Press Peking, pp.43–50 d. USA, 71:3672-3676

bank of Rhizobium meliloti. Proc. Natl. Acad. Sci. (8) Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. and Helin ski, D.R. (1980) Broadhost range DNA cloning syste m for Gram-negative bacteria: Constructionof gene

oltz, D.A. and Flick, J.S. (1985) The SEV system: a (9) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Eich new disarmed Ti plasmid vector for plant transfor

mation. Bio/technology, 3, 629-635.

(10) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., San (1983) Expression of bacterial genes in plant cel G.R., Coldberg, S.B., Hoffmann, N.L. and Woo, S.C. ders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M. L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi,

20

T. (1994) Efficient transformation of rice (Oryza sativa L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. The Plan (11) Hiei, Y., Chta, S., Komari, T. and Kumashiro, ls. Proc Natl Acad Sci USA, 80, 4803-4807. t Journal, 6, 271–282.

(12) Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. a 30 of the Agrobacterium tumefaciens Ti-plasmid. Natur strategy based on separation of vir- and T-region nd Schilperoort, R.A.(1983) A binary plant vector

Hoekema, A. (1993) NewAgrobacterium helper plasmid (1987) Virulence of Agrobacterium tumefaciens stra s for gene transfer to plants. Transgenic Res., 2, (14) Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S. and (13) Hood, E.E., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. in A281 on legumes. Plant Physiol, 83, 529-534. e, 303, 179-180.

erium tumefaciens A281 is encoded in a region of p (15) Hood, E.E., Helmer, G.L., Fralley, R.T. and Ch ilton, M.—D. (1986) The hypervirulence of Agrobact Ti80542 outside of T-DNA. J. Bacteriol., 168, 1291 208-218.

endonuclease map of pTiBo542, a potential Ti-plasm (16) Hood, E.E., Jen, G., Kayes, L., Kramer, J., F id vector for genetic engineering of plants. Bio/t raley, R.T. and Chilton, M.-D. (1984) Restriction

(17) Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., E ichholtz, D., Rogers, S. G. and Fraley, R. T. (1985)

8

A simple and general method for transferring gene (18) Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Ko mari, T. and Kumashiro, T. (1996) High efficiency s into plants. Science 227, 1229-1231.

Agrobacterium tumefaciens. Nature Biotechnol, 14, transformation of maize (Zea mays L.) mediated by

(19) Jefferson, R.A. (1987) Assaying chimeric gene s in plants: the QUS gene fusion system. Plant Mo 1. Biol. Rep., 5, 387-405.

E.W. (1987) Genes responsible for the supervirule (20) Jin, S., Komari, T., Gordon, M.P. and Nester, nce phenotype of Agrobacterium tumefaciens A281.

(21) Komari, T. (1989) Transformation of callus cu Bacteriol., 169, 4417–4425.

(22) Komari, T. (1990a) Genetic characterization o ltures of nine plant species mediated by Agrobacte rium. Plant Sci., 60, 223-229.

f double-flowered tobacco plant obtained in a tran sformation experiment. Theor. Appl. Genet.,80, 167

2

(23) Komari, T. (1990b) Transformation of cultured cells of Cheropodiumquinoa by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulenceregion of pTiBo542. Plant Cell Reports, 9, 303-306.

(24) Komari, T., Halperin, W. and Nester, E.W. (19 grobacterium tumefaciens tumor-inducing plasmid pT 86) Physical and functional map of supervirulent A 180542. J. Bacteriol., 166, 88-94.

(25) Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. an 30 d Kumashiro, T. (1996)Vectors carrying two separat e T-DNAs for co-transformation of higher plants me diated by Agrobacterium tumefaciens and segregatio n of transformants free from selection markers. Pl

etic Transformation: Agrobacterium tumefaciens. In (26) Komari, T. and Kubo, T. (1999) Methods of Gen vasil, I.K. (ed.) Molecular improvement ofcereal crops. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. ant J, 10, 165-174.

 $(2\mathcal{D}$ Li, H.-Q., Sautter, C., Potrykus, I. and Puon ti-Kaerlas, J. (1996)Genetic transformation of cas sava (Nanihot esculenta Crantz). Nature Biotechno 1., 14, 736-740.

(29) McCormick, S. (1991) Transformation of tomato Regeneration and transformation of sugarbeet by Ag robacterium tumefaciens. Plant Tissue Culture Manu (28) Lindsev, K., Gallois, P. and Eadv, C. (1991) al B7:1-13. Kluwer Academic Publishers.

特開2000-342256

(30) Murashiqe, T. and Skooq, F. (1962) Physiol. P ure Manual 86:1-9. Klumer Acadomic Publishers. lant 15:473-497.

dies on the mutritionof rice cell culture ${\rm L.}~{\rm A~sim}$ ple, defined medium for rapid growth in suspension (31) Chira, K., Ojima, K., Fujiwara, A. (1973) Stu culture. Plant Cell Physol., 14:1113-1121.

an intron within the coding sequence. Plant Cell P K. (1990) Constructionand expression in tabacco of $a\beta$ –glucuronidese (QJS) reporter gene containfind (32) Ohta, S., Mita, S., Hattori, T., Namamura, hysiol. 31: 805-813. 2

(33) Potrykus, I., Bilang, R., Futterer, J., Saut ter, C. and Schrott, M. (1998) Agricultural Biotec nology, NY:Mercel Dekker Inc. pp. 119-159.

sformed plants using Ti plasmid vectors. Method fo (1988) Gene transfer in plants: Production of tran r Plant Molecular Biology, CA: Academic Press Inc. (34) Rogers, S.C., Horsch, R.B. and Fralley, R. T. pp.423-436.

mosaic virus-tolerant transquaic tomato plants ex Y., Kumashiro, T. and Takanami, Y. (1992) Cucumber pressing a satellite RWA. Theor. Appl. Genet., 83, (35) Saito, Y., Komari, T., Masuta, C., Hayashi, 679-683.

(36) Toriyama, K. and Hinata, K. (1985) Plant Sci. 41:179-183

(37) Trick, H.N. and Finer, 3.3. (1997) SAAT: soni cation-assisted Agrobacterium-mediated transformat ion. Transgenic Research 6:329-336.

(38) Visser, R.G.F. (1991) Regeneration and transf ormation of potato byAqrobacterium tumefaciens. Pl ant Tissue Culture Manual 85:1-9. Kluwer Academic

ton, M.-D. and Nester,E.W. (1975) Plasmid required for virulence of Agrobacterium tumefaciens. J Bac (39) Watson, B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chil terriol, 123, 255-264. Publishers.

rs, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti p lasmid vector for the introduction of DNA into pla nt cells without alteration of their normal regene (40) Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leema ration capacity.EMBO 3, 2, 2143-2150.

[図1] 本発明の方法に好ましく用いることができるス [図面の簡単な説明]

ーパーパイナリーベクターの例であるpiuG33の構築方 法を示す図である。

【図2】本発明の方法に好ましく用いることができるスーパーパイナリーペクターの例であるp58133の遺伝子地

図を示す図である。 with Agrobacterium tumefaciens. Plant Tissue Cult 50

3

特開2000-342258 3

特開2000-342258

3

IFT ハイグロマイシン抵抗性遺伝子 *IC イントロンGUS通位子 【図3】アグロバクテリウム阿細菌の主要な2種類のベ クターシステムである中国ペクターシステムとパイナリ

Abr アンパッシン配和過行子 H 制限酵素HindIII 部位 K 勉阪摩米Kpn 1 部位 **ーペクターシステムの構築過程を示す模式図である。**

[図4] アグロバクテリウム ツメファシエンスの強病 原住苗株A281に由来する2 種類のパイナリーベクターシ

virß Agrobacterium tumefaciens A281だ含まれるTi ステムを示す模式図である。 【作号の説明】

Thos ノバリン合成酵素遺伝子のターミネーター Phos ノバリン合成酵素遺伝子のブロモーター

BAR bar遺伝子

10 CDS, cos ラムダファージのCOS部位

P35S CaM 355プロモーター

プラスミドprisoSA2のヴィルレンス競技中のvina適伝子

ORI, ori ColE1の複製開始点

virC Agrobacterium tumefaciens A281に含まれるTi グシスミ Feliso 22のグェラフンス 図数中の 2 ru組 印中 グラスミドprisoS2のヴィルレンス密数中のArca部の中 BL アグロバクテリウム属細菌のT-DNAの左ボーダ vinG Agrobacterium tumefaciens A281に含まれるTi

BR アグロバクテリウム原相核のT-DNAの右ボーダ

TC テトラサイクリン抵抗性遺伝子

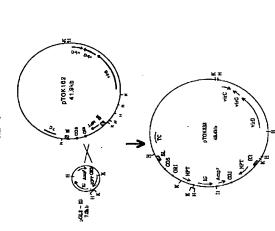
Vir アグロバクテリウム両袖菌のTiブラスミドの全Vir S vir 強病原性アグロバクテリウム腐細菌のTiブラス NPT,NPTII カナマイシン抵抗性遺伝子

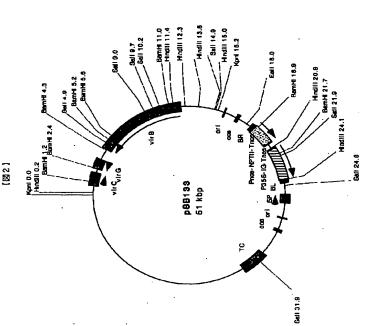
s vir TiブラスミドpTi8o342のvir鐵域の一部を含む

% FpTiBo542の金vida極

SP スペクチノマイツン抵抗性遺伝子

(<u>M</u>

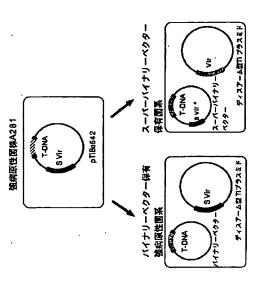




特開2000-342256

3

[🖾4]



ンロントページの梵字

スーパーバイナリーベクター

強病原性菌系によるパイナリ

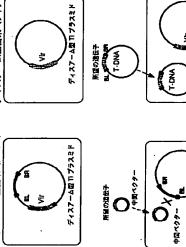
<u>-ペクターシステム</u>

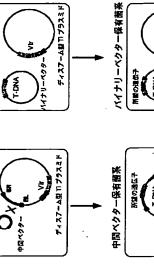
システム

48024 AA20 BA12 CA04 DA01 EA10 48065 AA11X AA89X ABO1 ABO3 AC10 BA25 BC50 CA31 CA60 ドターム(参考) 28030 AA02 A803 AIZO CAO6 CAL7 CA19 CB02 CD03 CD07 CD09 FA10 CA17 GA25 HA20 O)13 O)17

(72)発明者 石田 祐二 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本た ばこ産業株式会社遺伝育種研究所内

ディスアーム型商系 (タイプ2) (83) 野生型菌株 **居伍形成设伍子段去** ディスアーム型菌系 (タイプ1)





ディスプーム製TIプラスミド





中間ベクターシステム

バイナリーベクターシステム